



支原体检测系列说明书

支原体PCR检测试剂盒

Mycoplasma PCR Detection Kit

即用型

Mycoplasma PCR Detection Kit

支原体PCR检测试剂盒说明书



产品信息

产品名称	规格	储存条件
Mycoplasma PCR Detection Kit 支原体PCR检测试剂盒	20 Rnxs	-20°C 避光
	50 Rnxs	
	100 Rnxs	



产品优势

- **高广谱性**，可检测所有可能含有支原体的样品
- **高灵敏度**，可检测低至10 copies的支原体
- **高特异性**，真核生物、细菌的基因组不会被检测
- **高保真性**，本试剂盒含有阳标和阴标，可有效避免PCR反应假阴性和假阳性
- **操作简易**，本试剂盒的预混体系包含PCR反应所需试剂
- **耗时短**，本试剂盒能够在2小时内完成支原体检测



产品用途

《支原体PCR检测试剂盒》可用于检测所有可能含有支原体污染的样品，例如：细胞培养的上清；血清；胰酶；基础培养基；体液样品；其他样品。



产品描述

支原体是最小的原核生物，其大小介于细菌和病毒之间，约为0.1~0.3 μm ，且具有变形能力，可透过常见过滤膜（0.22~0.45 μm ），因此常规的无菌过滤方法不能将其去除；无细胞壁结构的特点，常规抗生素对其生长无法起到抑制作用；支原体在生长过程中是依靠宿主提供营养，吸附在细胞表面或之间，即为细胞污染物中最为主要的污染。由于支原体会使宿主细胞的代谢发生变化，进而导致细胞生长缓慢、分化和衰老死亡等现象，所以支原体污染检测是细胞制剂品或细胞科研的基础检测。

支原体PCR检测试剂盒是优选直扩式PCR酶扩增支原体基因组中保守16SrDNA而设计的，不会扩增细菌等其他基因组，兼具特异性和高灵敏性的特点，且本试剂盒检测范围广，可检测：(1)*M. Hyorhinis*，(2)*M. Fermentans*，(3)*M. Arginini*，(4)*M. hominis*，(5)*M. orale*，(6)*M. salivarium*，(7)*M. pirum*，(8)*Acholeplasma Laidlawii*，(9)*M. agalactiae*，(10)*M. bovis*，(11)*M. buccale*，(12)*M. arthritis*，(13)*M. pulmonis*等几乎所有常见的污染细胞的支原体(注：M.为Mycoplasma的缩写)。以上13种支原体约占细胞支原体污染的99%以上。绝大多数支原体污染集中于前8种。因此非常适合于与细胞生物学相关的科研实验室及企业的日常支原体检测。



🔬 质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过渗透压、pH 检测。
- 通过产品性能检测。

📖 使用方法

1. 样品准备

- 1.1 收集细胞培养液1mL，1000rpm离心5min。
- 1.2 缓慢吸取950μL上清液，13000rpm离心5min。
- 1.3 弃上清液。缓慢操作，请勿倒置或吸取离心管底部。

注：为增大检测灵敏度或减少培养液中的成分对PCR反应的抑制情况，可选择使用PBS清洗1至2次，13000rpm离心5min，弃上清。

1.4 加入50μL ddH₂O，混匀后，即为待测样品；若当日不进行检测，95°C加热5min，存放于-20°C保存。

2. 实验环境消除支原体

- 2.1 使用75%酒精对所需实验器材进行擦拭消毒。
- 2.2 使用去除支原体喷雾进行去除支原体，去假阳性污染源。
- 2.3 紫外照射30min，通风后方可使用。

3. 样品检测

3.1 分别吸取20μL**预混液**（PCR Master Mix，含染料，蓝色液体）至0.2mL PCR管中，缓慢加入，防止气泡产生。

3.2 将待检测样品和**阳标**（PCR Positive，紫盖管）及**阴标**（PCR Negative，白盖管）分别**按需**加入预混体系进行支原体检测。

注：操作时产生的微量气溶胶即可造成样品之间的相互污染，因此须小心谨慎，避免剧烈操作，为**避免阳标污染**，应最后添加含阳标各组。

3.3 建议检测体系如下：

测试管 试剂管	阴标	阳标	待检测样	待检测样+阳标
预混液	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL
待测样品	-	-	2 μL	2 μL
阴标	2 μL	-	-	-
阳标	-	2 μL	-	2 μL
预混体系总体积	22 μL	22 μL	22 μL	24 μL

注: 预混体系为反应优化的体系, 包含PCR所需的所有试剂, 并已添加染料 (蓝色), 反应后可直接进行电泳检测。**待检测样+阳标反应管**能够反映是否PCR反应会被抑制。建议检测时设置复孔, **复孔管**是为了提高检测的准确性。

3.4添加所有待检测样品后, 振荡器上混匀, 瞬时离心, 即可进行PCR扩增, 反应程序如下:

温度	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
时间	3 min	30 s	30 s	30 s	3 min	∞
循环数	1	35			1	1

注: 反应循环尽量不要超过35个, 过多的循环数会造成假阳性或杂带。

或执行TOUCHDOWN-PCR程序, 如下:

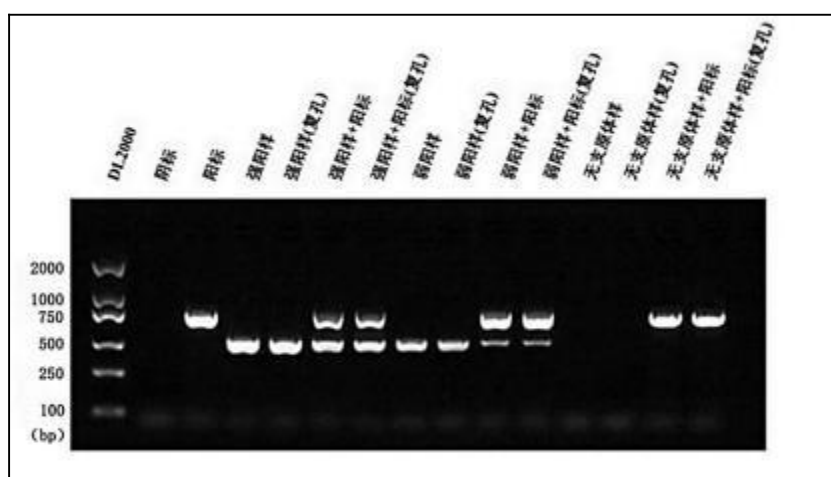
温度	94 °C	94 °C	68 °C	72 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
时间	3 min	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	3 min	∞
循环数	1	8 cycles, -1 °C / cycle			32			1	1

4.PCR产物检测

- 4.1 配制1.5%琼脂糖凝胶, 加热后加入适量GELRED用于紫外灯下显色。
- 4.2 吸取5 μ L PCR反应后的样品进行上样, DNA marker上样量为5 μ L。
- 4.3 电泳条件: 电压为120V, 20min左右 (可以根据实际情况进行时间调整)。
- 4.4 电泳结束后, 置于凝胶成像仪上拍照并保存结果。

5.结果分析

本试剂盒中的阳标大小为700 bp。支原体阳性的PCR扩增大小为500 bp左右。下图为使用本试剂盒进行检测的结果:



运输与保存方法

干冰运输。

-20°C 储存, 有效期为12个月。请合理分装, 避免反复冻融。

特别提醒

- 使用本试剂前请仔细阅读说明书;
- 本产品仅限于专业人员的科学研究使用, 不得用于临床诊断;
- 待细胞培养2~3天后, 细胞生长至80%汇合度(贴壁细胞)或密度达到 10^6 /mL(悬浮细胞)时取样进行检测;
- 预混体系应该在使用前彻底化冻, 瞬时离心后, 轻弹混匀;
- 在已灭菌的PCR管中配制反应体系, 每次实验均需至少加一个阴性和一个阳性对照, 测试反应管建议设置平行对照;
- 应该在专属区域进行检测, 避免交叉污染;
- 配制过程中应注意无菌, 戴口罩, 并注意避免操作产生的气溶胶造成样品间的交叉污染, 推荐在生物安全柜中进行操作;
- 加液时枪头最好贴着管壁, 所有管子用完即盖, 需添加阳标的各组留在最后, 取过样品的枪头用完即弃, 尽量减少操作时污染的可能性;
- 当PCR反应被强抑制时(即样品+阳标体系无法获得阳标条带), 建议使用PBS清洗, 同时补加2%BSA(需自备)后再进行检测;
- 本产品的检测范围涵盖所有支原体种类;
- 本产品不会检测真核细胞和革兰氏阴性菌的基因组DNA, 与支原体亲缘较近的革兰氏阳性菌在使用本产品检测时, 检测灵敏度也会降低10000倍, 进而减少假阳性和提高特异性;
- 检测结果异常时, 建议复检;
- 检测结果为弱阳性时, 建议继续37 °C培养7天后, 再进行复检。

参考文件

- 《中国药典》2020版 3301 支原体检查法
- 《中国药典》2020版 9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则
- 《终制品支原体检测标准操作规程》

Q 相关产品

产品	规格
细胞培养箱水盘安全卫士 (100×)	100 mL
水浴锅安全卫士(500×)	100 mL
实验室安全卫士	500 mL
支原体清除试剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
支原体高效清除剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
支原体清除试剂Plus (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
支原体预防试剂(2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
细胞污染高效清除剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
黑胶虫清除剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
真菌清除剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL
细菌清除剂 (2000×)	500 μL
	1 mL
	2 mL